

Las revistas científicas estructura y normalización

2 de 4: estructura de los artículos

Eduardo Giordanino

*Acuerdo de Bibliotecas
Universitarias de Córdoba*

19 y 20 de mayo 2011

Las revistas científicas

- ◆ Los artículos e informes de investigación
- ◆ Tipología
- ◆ Estructura del artículo científico: Estructura OMRC. Componentes
- ◆ La norma ISO 215
- ◆ Resúmenes
- ◆ Descriptores

Tipos de textos científicos

- ◆ Artículo
- ◆ Nota técnica
- ◆ Informe
- ◆ Revisión de la literatura
- ◆ Reseña de libros

Tipos de textos científicos

◆ Artículo (*paper*)

Informe basado en una sola investigación

Busca contribuir al progreso del conocimiento mediante información original

Estructura IMRAD: Introducción (objetivos, literatura previa), Materiales y métodos, Resultados, Análisis, Discusión (integración y conclusiones)

Para la Unesco, son “memorias originales”
(Sección Investigaciones)

Tipos de textos científicos

- ◆ Nota técnica (*technical note*)

Texto que brinda información de resultados preliminares o de una investigación en marcha (*work in progress*)

Para la Unesco, son “publicaciones provisionales” (Sección Comunicaciones)

Tipos de textos científicos

◆ Informe (*report*)

Texto escrito por encargo, basado en la necesidad de saber de un cliente o directivos.

Presenta los progresos realizados (sin detallar la metodología), su significado y las etapas subsiguientes.

Ejemplo típico de “literatura gris”, muy usual en tecnología, ingeniería

Tipos de textos científicos

- ◆ Revisión de literatura (*Literature review*)

Se basa en el análisis de las principales publicaciones sobre un tema determinado. Su objetivo es definir el estado actual del problema y evaluar las investigaciones realizadas. Su estructura responde a las fases del tema/problema: aportes de investigadores o equipos, cambios en la teoría o las corrientes teóricas principales; problemas sin resolver; tendencias actuales y futuras.

Para Unesco son “estudios recapitulativos”
(*advances in...*)

Tipos de textos científicos

- ◆ Reseña de libros (*Book reviews*)

Comentarios críticos con evaluación. Se basa en el conocimiento de la disciplina. Analiza los objetivos de la obra evaluada, el grado con que los alcanza y pondera su utilidad en el campo de estudios.

Estructura de las revistas científicas

- ◆ Editorial
- ◆ Cartas al editor
- ◆ Investigaciones (informes originales)
- ◆ Comunicaciones (informes de avance)
- ◆ Revisión de la literatura (estado del arte)
- ◆ Reseñas de libros
- ◆ Revista de revistas
- ◆ Obras recibidas
- ◆ Noticias del sector / área / disciplina
 - ◆ Otros: Retracciones, Instrucciones, Convocatorias

ISO 215 (1986)

FORMA de presentación de artículos
en publicaciones periódicas y demás
publicaciones en serie

- ◆ Autores + Editores = Artículo Científico
- ◆ Editores -> Autores
 - Herramientas:
 - ◆ Instrucciones para envío de trabajos
 - ◆ ISO 215
 - ◆ estilos

ISO 215

Objetivo: mejorar el acceso a la información contenida en publicaciones periódicas y otras seriadas, facilitando la recuperación de la información para beneficio de lectores y servicios de documentación.

Propósito: busca asistir a los autores en la presentación de sus manuscritos y asistir a los editores en la elaboración de guías para los autores.

ISO 215

Estructura

0. INTRODUCCION

1. ALCANCE Y AMBITO

2. REFERENCIAS [ISO relacionadas]

3. DEFINICIONES

4. ELEMENTOS DE IDENTIFICACION

5. TEXTO PRINCIPAL CONTRIBUCION

6. CONTRIBUCION PRESENTADA PARA OTRA APLICACION (informes, tesis, congresos, minutas)

7. ILUSTRACIONES Y TABLAS

8. DERECHOS DE AUTOR

ISO 215

ELEMENTOS DE IDENTIFICACION

1. TITULO
2. AUTORES, nombre y filiación
3. RESUMENES
4. FECHA de la contribución/trabajo

ISO 215

TEXTO DE LA CONTRIBUCION

1. ESTRUCTURA
2. TABLA DE CONTENIDO
3. NUMERACION DE LAS PARTES
4. NOTACION Y NOMENCLATURA
5. NOTAS AL PIE (excepcionalmente)
6. CITAS, ISO 690
7. RECONOCIMIENTOS
8. BIBLIOGRAFIA

LOS NOVENTA EN AMÉRICA LATINA: ¿LA DÉCADA DE LAS OPORTUNIDADES O DE LAS QUIMERAS?

Salvador Martí i Puig*

Fecha de recepción: abril 2000

Fecha de aceptación y versión final: septiembre 2000

Resumen: El presente artículo pretende elaborar una mirada crítica de lo acontecido en América Latina, a nivel político, durante los años noventa con el afán de responder porque a finales de la década se desvaneció el entusiasmo y las expectativas con que ésta empezó. Para ello el primer epígrafe da cuenta de la reaparición del fenómeno populista y la constante inestabilidad que caracterizó a los países de la región. Posteriormente se pasa a analizar el carácter de los regímenes democráticos resultantes de los procesos de transición desde sistemas autoritarios y el impacto social de las políticas económicas de ajuste liberal que aplicaron todos y cada uno de los administraciones latinoamericanas. Después se debate sobre el fenómeno recurrente de la violencia en la arena política y social, y sus múltiples formas desde los conflictos armados hasta la delincuencia criminal, y finalmente, se concluye con el dilema de futuro cual es la posición y el espacio de los ciudadanos en estos regímenes que dicen basar su legitimidad en el voto popular y el consenso.

Palabras clave: democracia, proceso de cambio político, neopopulismo, crisis política e inestabilidad institucional, América Latina, neoliberalismo.

Abstract: This article critically overviews the main political events that have been taking place throughout the 90s with the aim to respond why it is that the enthusiasm and expectations with which the decade started vanished at the end. With that purpose, the first part of this work gives account of the re-emergence of populism and the ascending instability that characterized the countries of the region. Subsequently, the character of the democratic regimes resulting from the transition processes and the social impact of the economic policies with neoliberal leanings applied by every single Latin American government, will be analysed. Subsequent to the debate over the recurrent phenomenon of violence in the social and political arenas, in its multiple forms (from the armed conflicts to the common delinquency), the article finally concludes with an intent to locate the spaces and positions of the citizens of these regimes that try to ground their legitimacy on popular vote and consensus.

Key words: Democracy, Institutional Changes, Neopopulism, Political Crisis, Political Instability, Latin America, Neoliberalism.

1. ¿OPTIMISMO DEMOCRÁTICO O RETÓRICA OFICIALISTA?

A inicios de la década de los noventa, en la Cumbre de las Américas realizada en Miami, William Clinton celebró que el continente americano (y dentro de éste América Latina) era el único del globo donde todos los países –con los notables excepciones de las islas de Cuba y Haití– gozaban de regímenes donde sus autoridades habían sido designadas por sufragio universal a través de comicios regularmente lógicos.

Un paisaje como el descrito difícilmente hubiera sido imaginado, ni por parte de los más optimistas, pocos lustros antes. Y es que, efectivamente, la ola de transiciones desde dictaduras hacia regímenes liberal-democráticos (iniciada a partir de inicios de los ochenta en Argentina y completada al inicio de los noventa en Chile) pilló por sorpresa a la mayor parte de científicos sociales –tal como lo exponen O'Donnell,

Schmitter y Whitehead (1986) al presentar su reflexión colectiva sobre las transiciones desde gobiernos autoritarios–.

Hasta la fecha todas las teorías elaboradas sobre los “cambios de regímenes” se habían centrado en el estudio de determinados factores (la cultura política, la modernización económica, la dependencia de las economías) y un plausible cambio (Karl, 1995). En ese entonces los estudiosos exponían que si estos tres factores estaban, también podrían hacerlo los regímenes, dándose la posibilidad de que aparecieran sistemas democráticos. Ciertamente, la quiebra de las dictaduras latinoamericanas no vino acompañada de ninguna transformación –en el sentido positivo– de los “factores” en cuestión: las experiencias represivas y autoritarias no dejaron ningún tipo de “cultura cívica”, las

* Profesor del Grado Político de la Universidad Autónoma de Barcelona. E-mail: salvador.marti@ub.es

TÍTULO DEL ARTÍCULO

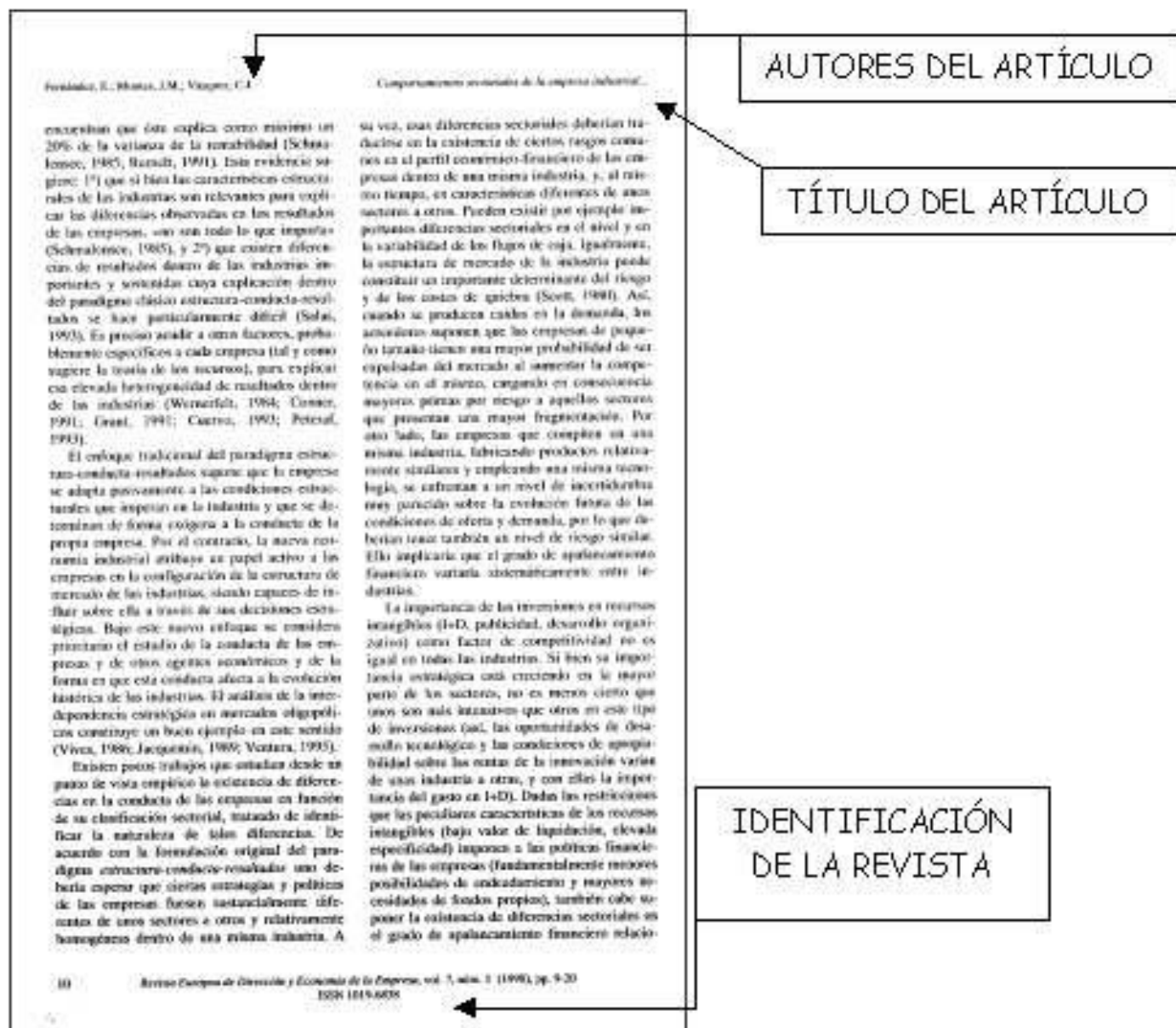
AUTOR

FECHA DE RECEPCIÓN Y
ACEPTACIÓN DEL
TRABAJO

RESÚMENES Y PALABRAS
CLAVE EN DOS IDIOMAS

LUGAR DE TRABAJO
DEL AUTOR

EJEMPLO DE IDENTIFICACIÓN DE LA REVISTA Y EL ARTÍCULO EN LAS PÁGINAS DEL TEXTO (MEMBRETE BIBLIOGRÁFICO)



Estructura (ISO 215 § 5.1)

- ◆ Debe seguir un plan lógico y claro
- ◆ Debe mencionar el propósito del trabajo y su relación con trabajos previos
- ◆ Las técnicas y métodos deben describirse de manera que puedan ser repetidas por el lector

Estructura (ISO 215 § 5.1)

- ◆ Los resultados, conclusiones y recomendaciones deben ser tratados en forma separada
- ◆ Una sección de “términos y definiciones” puede ser ubicada inmediatamente después de la introducción.

Estructura \cong ISO

- ◆ TITULO: subtítulo

- Autores, dirección
- Resumen
- Fecha

Elementos
identificatorios

- ◆ TEXTO contribución [OMRC]

- ◆ Notas al pie

- ◆ Créditos y reconocimientos

- ◆ Citas [“Referencias bibliográficas”]

- ◆ Bibliografía

- ◆ Anexos

- Erratas [editores]

Texto
principal

[Agregados]

Concepto de artículo

“Los artículos científicos originales son informes sobre trabajos de investigación efectuados, limitados en su extensión a lo sustancial del objeto o problemática en estudio y su estrategia de abordaje, sumado a las conclusiones a las que se arribó, realizados según las normativas establecidas por las organizaciones receptoras de los mismos.”

Rezzónico, *Comunicaciones e informes*, 2003

Estructura del artículo ISO 5966

Objetivos

Métodos

Resultados

Conclusiones

Estructura del artículo

Objetivos

Establecer los principales objetivos y el tema de estudio o las razones por las cuales el documento fue redactado, a menos que ello resulte ya evidente a través del título del documento o en otros párrafos. Mencionar la bibliografía anterior sólo cuando ésta forme parte integrante del objetivo.

Estructura del artículo

Métodos

Describir las técnicas, o trabajos de aproximación, únicamente en la medida en que sean necesarias para la comprensión del texto. Conviene identificar con exactitud las nuevas técnicas y describir el principio metodológico básico, el orden de las operaciones y el grado de precisión. Para documentos relativos a trabajos no experimentales, el resumen debe describir las fuentes y la forma de manipulación de los datos.

Estructura del artículo

Resultados (I)

Describir los nuevos descubrimientos de la manera más informativa posible. Estos elementos pueden ser resultados obtenidos tanto experimental como teóricamente, datos recopilados, relaciones o correlaciones observadas, efectos observados, etc.

Estructura del artículo

Resultados (II)

Cuando sean demasiado numerosos como para ser incluídos en su totalidad, se dará prioridad a alguna de las siguientes: hechos nuevos y verificados, novedades que tengan valor a largo plazo, descubrimientos significativos, novedades que contradigan las teorías previas, novedades que el autor sepa que son relevantes para un problema práctico. Se indicarán asimismo los límites de precisión y de fiabilidad, y los grados de validez de los resultados

Estructura del artículo

Conclusiones

Describir las consecuencias de los resultados y especialmente cómo se relacionan con el objetivo de la investigación o de la preparación del documento. Las conclusiones pueden estar asociadas con las recomendaciones, evaluaciones, aplicaciones, sugerencias, nuevas relaciones e hipótesis aceptadas o rechazadas

Estructura del artículo

- ◆ En primer lugar viene la "introducción"
- ◆ seguida por una sección "anteriores trabajos"...
- ◆ una sección sobre los "métodos"
- ◆ Y luego la sección de "resultados"
- ◆ "discusión"

Medawar, P.B. "Is the scientific paper a fraud?", En: *The Threat and the Glory. Reflections on Science and Scientists*. Harper Collins, New York, 1990, p. 228-233

Resumen

- ◆ “Representación abreviada y precisa del contenido de un documento, sin interpretación o crítica” (ISO)
- ◆ “Es un texto independiente, breve y gramaticalmente completo que recoge el contenido esencial del texto original. El objetivo principal del resumen es guiar al lector brindándole suficientes elementos que le permitan valorar la utilidad del texto de partida. Los objetivos generales de los resúmenes son mejorar la difusión de la información, facilitar la selección de la información pertinente y permitir una buena recuperación de la información” (Giordanino, 2010, p. 123)

Resumen

Tipos de resúmenes

- ◆ Informativo (*Informative abstract*)
- ◆ Indicativo (*Indicative abstract*)
- ◆ Notación del contenido (*Notation of content*)
- ◆ Extracto (*Extract, excerpta*)
- ◆ Compendio (*Digest*)
- ◆ Reseña (*Review*)

Resumen

Resumen informativo

Describe el contenido siguiendo la estructura, agregando una enumeración de las conclusiones principales. Su extensión máxima es de 300 palabras. Equivale a un sumario (*summary*), por incluir una recapitulación de las conclusiones.

Resumen

RESUMEN

Se desarrolla un método de electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) para monitorizar reacciones enzimáticas de glicosiltransferasas. En condiciones de flujo electroosmótico invertido a pH 2.5, el método permite la cuantificación de UDP, UDP-Gal, UDP-Glc y UDP-GlcNAc en el intervalo de 10 a 150 μ M. Se monitoriza la formación del subproducto UDP en la reacción de transglicosidación catalizada por la α -1,3-galactosiltransferasa para la determinación de su actividad enzimática. Este método es versátil y rápido, y no requiere derivatización de sustratos ni productos, a diferencia de los métodos de electroforesis capilar comunmente utilizados en la determinación de actividades glicosiltransferasa.

Palabras clave: Electroforesis capilar. Glicosiltransferasas. Actividad enzimática. UDP.

Ensayo enzimático de glicosiltransferasas mediante electroforesis capilar sin derivatización

Javier A. Linares-Pastén y Antoni Planas*

Laboratori de Bioquímica, Institut Químic de Santa, Universitat Ramon Llull, Via Augusta 390, 08017 Barcelona

Enzymatic Assay of Glycosyltransferases by Capillary Electrophoresis without Derivatization

Assaig enzimàtic de glicosiltransferases per electroforesi capilar sense derivatització

Recibido: 31 de enero de 2007; revisado: 10 de abril de 2007; aceptado: 3 de mayo de 2007

En memoria del Prof Joan Juli Bonet, padre científico y maestro

RESUMEN

Se desarrolla un método de electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) para monitorizar reacciones enzimáticas de glicosiltransferasas. En condiciones de flujo electroosmótico invertido a pH 2,5, el método permite la cuantificación de UDP, UDP-Gal, UDP-Glc y UDP-GlcNAc en el intervalo de 10 a 150 μ M. Se monitoriza la formación del subproducto UDP en la reacción de transglicosilación catalizada por la α -1,3-galactosiltransferasa para la determinación de su actividad enzimática. Este método es versátil y rápido, y no requiere derivatización de sustratos ni productos, a diferencia de los métodos de electroforesis capilar comúnmente utilizados en la determinación de actividades glicosiltransferasas.

Palabras clave: Electroforesis capilar. Glicosiltransferasas. Actividad enzimática. UDP.

SUMMARY

A high resolution capillary electrophoresis method is developed for monitoring enzymatic reactions catalyzed by glycosyltransferases. Under inverted electroosmotic flow conditions at pH 2.5, the method quantifies UDP, UDP-Gal, UDP-Glc, and UDP-GlcNAc in the range of 10 to 150 μ M. Enzyme activity of α -1,3-galactosyltransferase was determined by monitoring the formation of UDP subproduct formed in the transglycosylation reaction. The method is fast and versatile, and it does not require substrates nor products derivatization as opposed to common capillary electrophoresis methods used for glycosyltransferase activity measurements.

Key words: Capillary electrophoresis. Glycosyltransferases. Enzymatic activity. UDP

RESUM

Es desenvolupa un mètode d'electroforesi capilar d'alta resolució (HPCE) per a la monitorització de reaccions enzimàtiques de glicosiltransferasas. En condicions de fluxe electroosmòtic invertit a pH 2,5, el mètode permet la quantificació d'UDP, UDP-Gal, UDP-Glc i UDP-GlcNAc en l'interval de 10 a 150 μ M. Es monitoritza la formació del subproducte UDP en la reacció de transglicosilació catalitzada per la α -1,3-galactosiltransferasa per a la determinació de la seva activitat enzimàtica. Aquest mètode és versàtil i ràpid, i no requereix de derivatització de substrats ni productes, a diferència dels mètodes d'electroforesi capilar comunament emprats en la determinació d'activitats glicosiltransferasas.

Paraules clau: Electroforesi capilar. Glicosiltransferasas. Activitat enzimàtica. UDP.

INTRODUCCIÓN

Los nucleótidos de azúcares constituyen los sustratos donadores de las glicosiltransferasas tipo Leikr¹. Estas enzimas transfieren el azúcar (monosacárido) del donador al sustrato aceptor, para formar un nuevo enlace glicosídico formando un glicoconjugado. Uno de los principales intereses para el estudio de las glicosiltransferasas es su participación directa en la síntesis de los constituyentes

* Correspondencia: Antoni Planas aplana@iqc.us

del glicoconjugado. La glicobiología, dedicada al estudio de la estructura, biosíntesis y funciones biológicas de los oligosacáridos y glicoconjugados ha experimentado recientemente un espectacular desarrollo debido a su papel central en los procesos de reconocimiento y señalización celular, participando en procesos tan diversos como el desarrollo embrionario, sistema inmunitario, infecciones bacterianas y víricas, o transformación celular en los procesos de metástasis²⁻⁴. Los ensayos enzimáticos para glicosiltransferasas pueden monitorizar el consumo de los sustratos donadores o la formación de los productos. Al respecto, una variedad de métodos han sido desarrollados, tales como radiométricos, cromatográficos, inmunológicos, espectrofotométricos, y más recientemente por electroforesis capilar⁵⁻⁸. La electroforesis capilar (CE) ha llegado a constituirse en una herramienta analítica muy poderosa. Esta técnica tiene una alta capacidad de resolución, requiere de baja cantidad de muestra, la detección es altamente sensible y es un método automatizable. Así por ejemplo, su aplicación al análisis de nucleótidos y sobre todo de oligonucleótidos ha permitido desarrollar métodos altamente automatizados para la secuenciación de genomas, que en la actualidad son de uso rutinario en muchos laboratorios de biología molecular.

La electroforesis capilar aplicada al estudio de reacciones de glicosiltransferasas ha sido enfocada teniendo en cuenta el análisis de los carbohidratos participantes⁹⁻¹⁰. De esta manera se han tenido que solventar dos dificultades: (1) ausencia de grupo funcional con carga en carbohidratos neutros que les confiera movilidad electrofórica y (2) ausencia de grupos cromóforos o fluoróforos, necesarios para la detección espectrofotométrica^{11,12}. Por tanto, las estrategias empleadas han consistido en complejar los carbohidratos con borato^{13,14} o derivatizarlos con grupos funcionales que aportan carga y cromóforos o fluoróforos. Las reacciones de derivatización más típicas son la aminación reductiva con aminas aromáticas, tales como 2-aminohipridina, ácido p-aminobenzoico o ácido 8-amino-1-naftaleno-1,3,5-trisulfónico (ANTS)¹⁵⁻¹⁷. Las reacciones de derivatización de los carbohidratos requieren de un tiempo corto y condiciones adecuadas para obtener buenos rendimientos, y por otra parte, si se derivatizan los sustratos, estos pueden perder la capacidad de unirse al enzima o modificar su actividad. Un método recientemente desarrollado en nuestro grupo consiste en la derivatización posterior a la reacción enzimática, de esta manera se evita la alteración de los sustratos y además se pueden estudiar diferentes sustratos⁸. Siguiendo esta línea en la búsqueda de métodos versátiles de elec-

troforesis capilar para monitorizar ensayos de actividad de glicosiltransferasas, se ha desarrollado uno nuevo que no requiere derivatización.

Las reacciones que catalizan las glicosiltransferasas tipo Leikr incluyen azúcar nucleótidos como donadores. La parte nucleotídica de estos sustratos consiste en una base nitrogenada, que en la mayoría de los casos es uridina, y ácido como cromóforo con un máximo de absorción a 270nm. Además, los grupos fosfato confieren carga negativa. De esta manera, están presentes los dos requerimientos para realizar el análisis por electroforesis capilar, monitorizando tanto el consumo de azúcar nucleotídico (donador) como la producción de nucleótido libre (producto secundario), sin necesidad de ninguna derivatización (Figura 1).

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método versátil y rápido de electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) sin derivatización de ninguno de los sustratos, que permita el análisis de una amplia variedad de sustratos tanto aceptores como donadores. La actividad enzimática es monitorizada en un ensayo discontinuo, donde se toman aliquotos de la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo, los cuales se calientan para detener la reacción por desnaturalización del enzima. Posteriormente, los aliquotos se inyectan para ser analizados directamente por HPCE.

El enzima empleado para el desarrollo y aplicación del método es la α -1,3-galactosiltransferasa (EC 2.4.1.151). Esta enzima transfiere la galactosa del UDP-Gal a un aceptor que puede ser N-acetilglucosamina o lactosa (Figura 1), y sintetiza la secuencia terminal Gal:3Gal:4GlcNAc de carbohidratos de glicoproteínas y glicolípidos de las superficies celulares de muchos mamíferos, con excepción del hombre y mones del Viejo Mundo¹⁸. La estructura del disacárido terminal Gal:3Gal se conoce como epitopo de GalII y es el principal xenoantígeno implicado en el rechazo inmunológico heterólogo en el xenotransplante de órganos o tejidos del cerdo al hombre^{19,20}. Por tal motivo, la α -1,3-galactosiltransferasa es de gran interés biomédico en la actualidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. UDP-galactosa, UDP-glucosa, UDP-N-acetilglucosamina, lactosa, UDP y HEPES (Sigma). Patrón (2mg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA) (Pierce). Ácido 8-amino-1-naftaleno-1,3,5-trisulfónico (ANTS) (Fluka). El agua utilizada en la preparación de tampones se de calidad ultra-pura (resistividad 18,2 M Ω · cm a 25 °C).

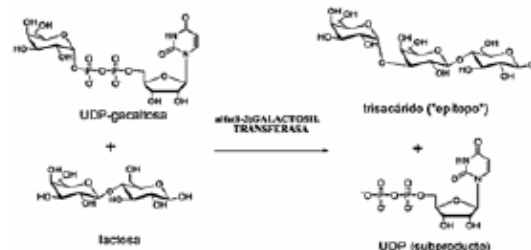


Figura 1. Reacción catalizada por la α -1,3-galactosiltransferasa.

TABLA I

Condiciones de electroforesis capilar empleadas. Se utilizó un equipo de electroforesis capilar Hewlett-Packard HP[®] CE US-10034 1R-06 y las muestras son analizadas en las siguientes condiciones y etapas.

1. Acondicionamiento inicial del capilar:	30 min NaOH 0.1 N 10 min H ₂ O Milli-Q 10 min tampón de electroforesis
2. Análisis de la muestra: Capilar de burbuja:	de sílice fundida y $\phi_{\text{int}} = 3 \phi_{\text{ext}}$ $L_{\text{int}} = 60.5$ cm $L_{\text{ext}} = 72$ cm $\phi_{\text{ext}} = 50$ μ m Isotato de TEA a pH 2.5 40 mbar durante 12 s de muestra 4 mbar durante 5 s de tampón
Tampón de electroforesis: Inyección hidrodinámica:	Isotato de TEA a pH 2.5 40 mbar durante 12 s de muestra 4 mbar durante 5 s de tampón
Voltaje de separación:	-30 kV (rampa inicial 0-30 kV en 1 min)
Temperatura: Detección:	30 °C 270, 20 nm/Ref. 450, 80 nm 224, 20 nm/Ref. 450, 80 nm
Acondicionamiento entre inyecciones:	5 min tampón de electroforesis
3. Limpieza del sistema al finalizar la sesión:	15 min H ₂ O Milli-Q 15 min aire

α -1,3-Galactosiltransferasa bovina recombinante.- Dominio catalítico de la α -1,3-galactosiltransferasa bovina (aminoácidos 80-366) expresado en *E. coli* BL21(DE3) y purificado por cromatografía de afinidad⁸.

Condiciones de reacción para la α -1,3-galactosiltransferasa.- La mezcla de reacción enzimática se preparó con UDP-Gal 1 mM, lactosa 10 mM, MnCl₂ 13 mM, BSA 0.13 mg/ml, KCl 13 mM, HEPES 13 mM, pH 7.0, y la enzima α -1,3-galactosiltransferasa (50 nM). Se incubó a 30 °C y se fueron tomando alícuotas de 20 μ l en diferentes intervalos de tiempo. Para cada alícuota se paró la reacción calentando a 98 °C por 30 s, se enfrió y se añadió 5 μ l de patrón interno ANTS (50 μ M, concentración final). Las muestras así obtenidas se analizaron por electroforesis capilar.

Análisis por electroforesis capilar.- La electroforesis capilar se realizó en un equipo Hewlett-Packard HP[®] CE G1600 AX equipado con un detector de diodo array UV-Vis. Las condiciones experimentales se detallan en la Tabla I.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo del método electrofórico

Se implementó un nuevo método de HPCE para monitorizar la actividad de la α -1,3-galactosiltransferasa, sin necesidad de derivatizar ningún sustrato ni producto. El nucleótido presente en el sustrato donador (UDP-Gal) y presente también en el subproducto (UDP) posee la carga para la movilidad electrofórica a través de los grupos fosfato, y la uridina aporta el cromóforo para la detección por absorbancia a 270 nm (figura 1).

En base a estudios anteriores de separación electrofórica de carbohidratos derivatizados con ANTS⁹⁻¹² y dado que el pKa y el máximo de absorbancia del UDP se asemejan mucho a los del ANTS, se ensayó el mismo método de HPCE para la separación de nucleótidos. En el desarrollo del método de separación de carbohidratos derivatizados con ANTS se analizaron mezclas equimolares de glucosa, lactosa, celobiosa, maltosa, maltotriosa y

maltotetraosa. Los flujos electroosmóticos (EOF) empleados fueron de tipo directo (pH 9), suprimido (pH 2.5) e invertido (pH 2.5) con tampón de trietilamina (TEA). Este último proporcionó mejores resultados y tiene la ventaja de que la TEA tiene baja movilidad electrofórica, lo cual permite la aplicación de altos voltajes al mismo tiempo que mantiene baja la intensidad de corriente, confiriendo así mayor eficiencia al método. Por tal motivo, en el presente trabajo se emplearon las condiciones de EOF invertido (selección anódica). El tampón de electroforesis se preparó con ácido fosfórico 50 mM y ajustando el pH a 2.5 con TEA. Las condiciones de electroforesis capilar se detallan en la Tabla I.

Los azúcar nucleótidos analizados (sustratos donadores) fueron UDP-Gal, UDP-Glc y UDP-NacGal, y el UDP (producto secundario). Además se utilizó ácido 8-aminoantelen-1,3,5-trisulfónico (ANTS) como patrón interno. Se realizaron mezclas equimolares de cada uno de ellos con UDP y entre ellos, disueltos en el mismo tampón que se utilizó en las reacciones enzimáticas (50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl, 13 mM MnCl₂, 0.13 mg \cdot mL⁻¹ BSA). Se obtuvieron resoluciones eficientes entre el UDP y cada uno de los azúcar nucleótidos (Figura 2). El ANTS eluye a los 6.6 min, el UDP a los 7.9, mientras que el UDP-Gal está presente en dos especies, la primera y mayoritaria con un tiempo de migración de 8.5 min, y la segunda (segundo pico) a los 10.7 min. La UDP-Glc presentó tiempos de migración similares a la UDP-Gal, en cambio, la UDP-NacGal muestra un solo pico a los 8.5 min.

Con patrones comerciales de UDP-Gal y UDP-Glc se ha observado que estos azúcares nucleótidos dan lugar a dos picos, el primero a 8.55 y el segundo a 10.72 min. Este comportamiento es más evidente cuando el UDP-Gal o UDP-Glc están en disolución tampón y, dependiendo del pH y de la concentración de otros electrolitos presentes, uno de los picos puede tener mayor área que el otro. La existencia de los dos picos se atribuye a dos especies con cargas diferentes del mismo UDP-Gal o UDP-Glc, aunque se desconoce la naturaleza de ambas especies. Por ello se determinó su relación en las condiciones de trabajo (20-300 μ M UDP-Gal, 50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl).

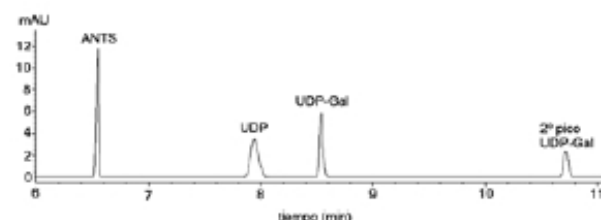


Figura 2. Electroferograma (condiciones de EOF invertido) de una mezcla de ANTS, UDP y UDP-Gal.

13 mM MnCl₂, 0.13 mg \cdot mL⁻¹ BSA, 30 °C), definida como el cociente del área del segundo pico por el área del primero (Figura 3).

En estas condiciones, el segundo pico representa un área de aproximadamente el 40% de la del primer pico. Existe una alta correlación lineal de las áreas entre ambos picos (Figura 3A), considerando que la relación de áreas entre ambos picos está dentro de un $\pm 15\%$ del valor promedio para todo el intervalo de concentración de UDP-Gal (Figura 3B). La relación entre ambas especies es de 0.4.

Validación del método electrofórico

La repetibilidad de los tiempos de migración y área de los picos para cada uno de los analitos fue determinada a partir de 12 y 8 inyecciones, respectivamente (Tabla II). En todos los casos, los coeficientes de variación porcentuales (C.V. %) fueron muy inferiores al 5%, lo cual indica una alta repetibilidad tanto de los tiempos de migración como en las inyecciones de las muestras.

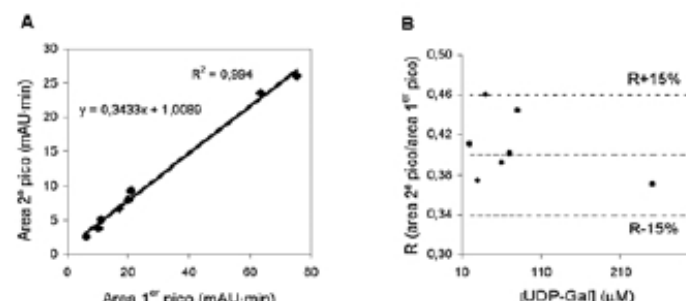


Figura 3. (A) Correlación de áreas del 1º pico y 2º pico correspondientes a las dos especies de la UDP-Gal. (B) Relación de áreas de ambos picos.

TABLA II
Repetibilidad de tiempos de migración y de áreas de los analitos.

		ANTS	UDP	UDP-Gal (1º pico)	UDP-Gal (2º pico)
Tiempo de migración ^a	Promedio (min)	6.56	7.94	8.55	10.72
	Desviación estándar C.V. (%)	0.02 0.20	0.05 0.64	0.05 0.58	0.06 0.73
Área ^b	Promedio (mAU·min)	20,956	20,979	16,400	8,545
	Desviación estándar C.V. (%)	0.032 0.245	0.044 0.210	0.118 0.714	0.036 0.423

^a Parámetros estadísticos para el tiempo de migración obtenidos a partir de 12 inyecciones.

^b A concentración 80 μ M de analito. Parámetros estadísticos obtenidos a partir de 8 inyecciones.

Se estableció el límite de detección como tres veces la altura del pico del analito respecto del ruido de la línea base, mientras que límite de cuantificación se estableció como 10 veces la altura del ruido de la línea base. Así, el límite de detección determinado fue de 2 μM , mientras que el de cuantificación fue de 15 μM , para los analitos estudiados (UDP, UDP-Gal, y UDP-NAcGal). Para evaluar la linealidad del método, se realizaron las curvas patrón para el UDP y UDP-Gal. Las diluciones de

estos analitos se prepararon juntamente con los otros componentes de la mezcla de reacción. Para el UDP-Gal se sumaron las áreas de los dos picos que presenta en el electroferograma. En estas condiciones se obtuvo que los factores de respuesta de cada uno de los analitos son similares y el método es lineal en el intervalo estudiado de 10 a 250 μM (Figura 4).

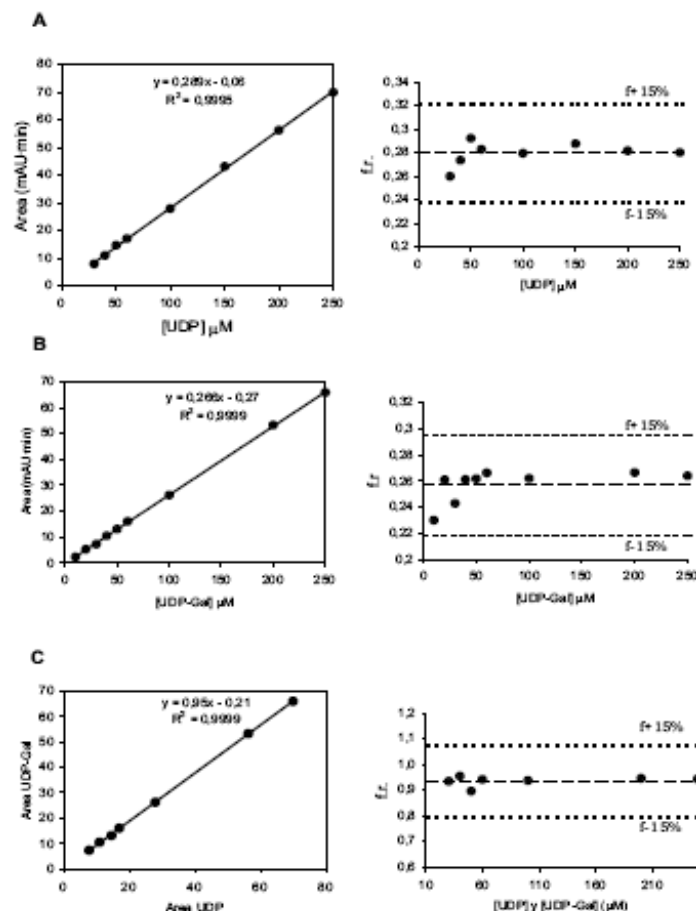


Figura 4. Rectas patrón y correspondientes factores de respuesta ($f.r.$) de los analitos: (A) UDP y (B) UDP-Gal. (C) Relación de áreas de UDP-Gal respecto a las de UDP.

Aplicación a la monitorización de la reacción de la α -1,3-galactosiltransferasa

El enzima empleado es una α -1,3-galactosiltransferasa bovina recombinante, expresada en *E. coli* como una proteína truncada (dominio catalítico, aminoácidos 60-368), y purificada por cromatografía de afinidad tal como se describe en Monreal et al.²⁶ La reacción catalizada por este enzima consiste en la transferencia de galactosa del UDP-Gal a la lactosa o N-acetilglucosamina (Figura 1). El producto formado es el trisacárido Gal-3Gal-4Glc o Gal-3Gal-4GlcNAc respectivamente.^{26, 27} Las condiciones de reacción fueron 50 mM HEPES pH 7, 50 mM KCl, 13 mM MnCl₂, 0.13 mg \cdot mL⁻¹ BSA, 30 °C. El seguimiento de la reacción es discontinuo, tomando alícuotas de 20 μL de la reacción a diferentes intervalos de tiempo, se añade el patrón interno ANTS y se para la actividad enzimática por calentamiento a 98 °C durante 30 s. Con este tratamiento térmico se inactiva el enzima (actividad residual no detectable) y el UDP-Gal no experimenta hidrólisis espontánea (verificado sobre patrones). Las muestras así preparadas se analizaron por HPCE obteniéndose electroferogramas como el mostrado en la Figura 5 donde sustrato y producto de reacción se iden-

tifican por su tiempo de migración referido a patrones (Figura 2). Durante la monitorización de la reacción, la suma de áreas de las señales correspondientes al UDP y UDP-Gal (que tienen un factor de respuesta similar (95%) Figura 4c) se mantiene constante (Figura 6), con un coeficiente de variación cercano al 1%, lo que indica que no se produce ninguna reacción secundaria.

En la monitorización de la cinética enzimática, los cálculos para la determinación de la concentración de producto formado (UDP) en cada intervalo de tiempo se pueden realizar de dos maneras:

- (1) Por normalización interna, que consiste en el cociente del área del pico del producto (UDP) por la suma total de áreas de producto + sustrato (UDP-UDP-Gal):

$$[\text{UDP}] = [\text{UDP} + \text{Gal}] \times \left(\frac{\text{Área UDP}}{\text{Área UDP} + \text{Área UDP-Gal}} \right) \quad (1)$$

donde $[\text{UDP} + \text{Gal}]$ es la concentración inicial de UDP-Gal utilizada en la reacción.

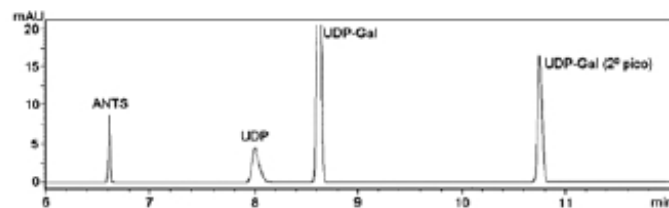


Figura 5. Electroferograma de una muestra de reacción enzimática de la α -1,3-galactosiltransferasa.

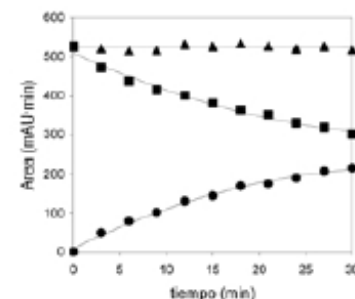


Figura 6. Curva de progreso de la reacción de la α -1,3-galactosiltransferasa a pH 7 y 30 °C. Área de los picos en los electroferogramas para el UDP (■), UDP-Gal (▲) y suma de áreas (UDP-Gal + UDP) (●).

- (2) Por interpolación directa del área de producto en la recta patrón de UDP (Figura 4). Ambos métodos proporcionan resultados similares con variaciones inferiores al 0.5%. Como el área del patrón interno (ANTS) se mantiene constante en las diferentes muestras del curso de reacción (CV < 0.2%), se utiliza el primer método de normalización interna para el cálculo de la concentración de producto en función del tiempo de reacción.

La velocidad inicial de reacción enzimática se define como aquella en la cual la formación de producto no supera el 10% de rendimiento. Así, se determinó la velocidad inicial de la α -1,3-galactosiltransferasa a concentraciones altas (saturación) de sus sustratos UDP (1 mM) y lactosa (10 mM) (Figura 7). Estos valores de concentración fueron establecidos como niveles de saturación en experimentos radio-métricos.²⁸

La actividad enzimática específica (cociente de la velocidad inicial por la concentración de enzima en la reacción) obtenida mediante el método de HPCE para α -1,3-galactosiltransferasa fue 1.46²⁹. Este valor es consistente con valores de velocidad máxima obtenidos en condiciones de saturación de sustratos mediante el método radio-métrico, más sensible, que rindió 1.62^{29 30}.

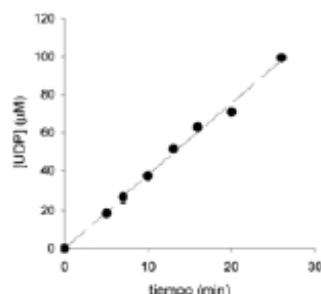


Figura 7. Velocidad inicial para la reacción de la α -1,3-galactosiltransferasa en condiciones de saturación de sustratos. $V_0 = 3.78 \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1}$.

CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un nuevo método de HPCE sin derivatización ni ningún otro tipo de marcaje, y validado para la cuantificación de UDP y azúcar nucleótidos en un intervalo de concentración de 10 a 250 μM . El método ha sido aplicado a la monitorización de la actividad de la α -1,3-galactosiltransferasa. La ventaja de este método sobre el método radioisotópico es que no se requiere manipular compuestos radioactivos. En comparación con otros métodos de HPCE descritos para galactosiltransferasas no requiere reacciones de derivatización de sustratos y/o productos, lo cual tiene las siguientes ventajas: (1) se evita la síntesis preparativa y purificación de sustratos aceptores marcados, (2) la reacción enzimática se lleva a cabo en condiciones normales sin interferencia de marcas añadidas en sustratos aceptores, (3) se evita las etapas de liofitización-derivatización-liofitización posteriores a la reacción enzimática. Por otra parte, este método se está empleando en nuestro laboratorio para determinar actividad de galactosiltransferasas a partir de extractos crudos, lo cual constituye una ventaja sobre los métodos espectrofotométricos basados en ensayos acoplados (consumo de NADH acoplado a la formación de UDP mediante los enzimas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa)³¹ en los que otros componentes celulares interfieren. Este método simple, rápido y directo, no solamente es aplicable a la determinación y caracterización de galactosiltransferasas, sino también para la monitorización de síntesis enzimática de azúcar nucleótidos.

ABREVIATURAS

ANTS, ácido 8-aminonaphthaleno-1,3,6-trisulfónico; EOF, flujo electroosmótico; HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinasulfónico; BSA, albúmina de suero bovino.

BIBLIOGRAFÍA

- ³¹ Fukuda, M. y Hindsgaul, O. (2000): «Molecular and Cellular Glycobiology», (Frontiers in Molecular Biology), Second ed. Oxford Univ. Press.
- ³² Pohl, N. (2004): «Cellular Addressing, Step One in Creating a Glycocode», *Chemistry & Biology*, 11, 891-892.

- ³³ Jociusse, D. H. y Ortol, R. (1999): «Xenotransplantation, the importance of the Gal α 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection», *Biochim. Biophys. Acta* 1455, 403-418.
- ³⁴ Allahverdian, S.; Pachall, J. B. y Donschock, D. R. (2006): «Carbohydrates and Epithelial Repair - More Than Just Post-Translational Modification», *Current Drug Targets* 7, 507-508.
- ³⁵ Palick, M. M. y Sujino, K. (2001): «Assays for glycosyltransferases», *Trends Glycosci. Glyc.* 13, 361-370.
- ³⁶ Monesgal, A.; Pinyol, R. y Planas, A. (2005): «Capillary electrophoresis method for the enzymatic assay of galactosyltransferases with post reaction derivatization», *Anal. Biochem.* 346, 115-123.
- ³⁷ Lee, K. B.; Desai, U. R.; Palick, M. M.; Hindsgaul, O. y Lihardt, R. J. (1992): «An electrophoresis-based assay for glycosyltransferase activity», *Anal. Biochem.* 205, 108-114.
- ³⁸ Li, X. G.; Zhang, Y.; Dovich, N. J.; Compston, C. A.; Palick, M. M.; Beaver, R. J.; Hindsgaul, O. (1997): «Study of the enzymatic transformation of fluorescently labeled oligosaccharides in human epididymal cells using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection», *J. Chromatogr. A* 781, 515-522.
- ³⁹ Kanis, Y.; Kirsh, A.; Kanis, O. y Wong, C. H. (1995): «Enzymatic assay of galactosyltransferase by capillary electrophoresis», *Anal. Biochem.* 263, 240-245.
- ⁴⁰ Snow, D. M. (1999): «Determination of α -1,4-galactosyltransferase enzymatic activity by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection», *Anal. Biochem.* 271, 38-41.
- ⁴¹ Wakarchuk, W. W. y Cunningham, A. M. (2003): «Capillary electrophoresis as an assay method for monitoring glycosyltransferase activity», *Methods Mol. Biol.* 213, 263-274.
- ⁴² El Rassi, A. (2003): «Capillary electrophoresis of Carbohydrates», Humana, Totowa, NJ, USA.
- ⁴³ Suzuki, S. y Honda, S. (1998): «A tabulated review of capillary electrophoresis of carbohydrates», *Electrophoresis* 19, 2530-2540.
- ⁴⁴ Paulus, A. y Klockow, A. (1995): «Detection of carbohydrates in capillary electrophoresis», *J. Chromatogr. A* 720, 353-376.
- ⁴⁵ Hoffstetter-Kuhn, S.; Ann, P.; Gessmann, E. y Widmer, R. (1991): «Influence of borate complexation on the electrophoretic behavior of carbohydrates in capillary electrophoresis», *Anal. Chem.* 63, 1541-1547.
- ⁴⁶ Honda, H. (1993): «Separation of neutral carbohydrates by capillary electrophoresis», *J. Chromatogr. A* 720, 337-351.
- ⁴⁷ Klockow, A.; Amadó, R.; Widmer, M.; Paulus, A. (1995): «Separation of 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid-labeled neutral and silylated N-linked complex oligosaccharides by capillary electrophoresis», *J. Chromatogr. A* 716, 241-257.
- ⁴⁸ Kakehi, K.; Funakubo, T.; Suzuki, S.; Oda, Y. y Kitada, Y. (1999): «3-Aminobenzamide and 3-aminobenzole acid, tags for capillary electrophoresis of complex carbohydrates with laser-induced fluorescence detection», *J. Chromatogr. A* 863, 205-216.
- ⁴⁹ O'Shea, M. G.; Samuel, M. S.; Konik, C. M. y Mrell, M. K. (1995): «Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides, efficiency of labelling and high-resolution separations», *Carbohydr. Res.* 307, 1-12.
- ⁵⁰ Evangelista, R. A.; Liu, M. S. y Chn, F. T. A. (1995): «8-Aminopyrene-1,4,6-trisulfonate derivatized sugars by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection», *Anal. Chem.* 67, 2239-2245.

- ⁵¹ Chiesa, A. y O'Neill, R. A. (1994): «Capillary electrophoresis of oligosaccharides derivatized with various amino-naphthalene sulfonic acids», *Electrophoresis* 15, 1132-1140.
- ⁵² Gall, U.; Shohet, S. B.; Kobrin, E.; Stals, C. L. y Machor, B. A. (1989): «Man, ape and Old World monkey differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes in nucleated cells», *J. Biol. Chem.* 264, 17755-17762.
- ⁵³ Gall, U. (2001): «The α -gal epitope (Gal α 1,3 Gal β 1,4GalNAc-R) in xenotransplantation», *Biochimie* 83, 557-563.
- ⁵⁴ Chen, X.; Andras, P. R. y Wang, P. G. (1999): «Carbohydrates in transplantation», *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 650-658.
- ⁵⁵ Chiesa, C. y Hornath, C. (1993): «Capillary zone electrophoresis of malto-oligosaccharides derivatized with 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acids», *J. Chromatogr. A* 645, 337-352.

- ⁵⁶ Holke, C. H.; Zervosen, A.; Elling, L.; Jociusse, D. H. y van den Eljnden, D. H. (1996): «One-pot enzymatic synthesis of the Gal α 1-3 Gal β 1-4GalNAc sequence with *in situ* UDP-Gal regeneration», *Glycoconj. J.* 13, 687-692.
- ⁵⁷ Baloch, G.; Orlan, R.; Kolbinger, F. y Straff, M. (1999): «On the preparative use of recombinant pig α 1-3galactosyltransferase», *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 1575-1578.
- ⁵⁸ Monesgal, A.; Bulone, V. y Planas, A. (2005): «Caracterización enzimática de la α -1,3-galactosiltransferasa bovina. Validación de un ensayo radioisotópico y mecanismo cinético», *Armadad* 62, 505-512.

Resúmenes

Principios que deben cumplir

- ◆ Entropía
- ◆ Pertinencia
- ◆ Coherencia
- ◆ Corrección lingüística
- ◆ Estilo
- ◆ Informatividad

Moreiro González (2004)

Descriptores

Son conceptos extraídos de un vocabulario controlado que describen el contenido de un documento (Mooers)

◆ Deben reflejar fielmente lo que se estudió y discutió en el artículo, y no aquello que sólo fue mencionado (Greene y Castro, 1999)

Descriptores

Objetivos:

- ◆ Identificar los principales temas tratados (de forma más sintética que el resumen)
- ◆ Facilitar la preparación del índice temático de las revistas y la indización de los artículos en las bases de datos
- ◆ En las bases de datos: identificar los principales temas y todos los aspectos relacionados (según un vocabulario controlado)
- ◆ Facilitar la búsqueda temática de artículos, permitiendo combinación de términos

Descriptores

El título, el resumen y los descriptores son la tarjeta de presentación del artículo científico

- ◆ **TÍTULO:** debe ser claro, conciso y preciso; debe definir el contenido del artículo
- ◆ **RESUMEN:** texto que sintetiza las principales ideas del artículo, siguiendo la estructura OMRC: objetivos, métodos, resultados, conclusiones
- ◆ **DESCRIPTORES:** son conceptos que reflejan el contenido del artículo

Metas de la normalización

- ◆ Mejorar la comunicación con los autores e investigadores
- ◆ Mejorar las instrucciones para los autores
- ◆ Mejorar los procesos y operaciones de recepción de contribuciones
- ◆ Mejorar la calidad de los procesos de la revista científica/académica